

WO 01/25415 A2

Gentransfer in humane Lymphocyten mittels retr viraler scFv-Zelltargeting Vektoren

Die Erfindung betrifft den Gentransfer in humane Lymphocyten, insbesondere T-Lymphocyten mittels retroviraler scFv-Zelltargeting-Vektoren und die Verwendung dieser Vektoren zur Gentherapie, Impftherapie oder Diagnostik, insbesondere zur Therapie T-Zell-assoziiierter Krankheiten.

Die Mehrheit der retroviralen Vektoren, die in der gentherapeutischen Forschung zur Zeit benutzt werden, stammen vom amphotropen Maus-Leukämie-Virus (MLV) ab. Der Wirtszellbereich des amphotropen MLV wird durch das Oberflächenhüllprotein (SU) bestimmt, das vom env-Gen codiert wird. Die Proteinprodukte des env-Gens bilden die äußere Hülle des retroviralen Vektors. Die SU-Proteine interagieren mit, d.h. sie binden an ein bestimmtes Protein (Rezeptor) auf der Oberfläche der Wirtszelle. Die env-Genprodukte des amphotropen MLV erlauben den Gentransfer in eine große Anzahl unterschiedlicher Säugerzellen. Ein selektiver Gentransfer in bestimmte Zell- oder Gewebetypen des Menschen oder anderer Säuger ist mit amphotropen MLV-Vektoren aber nicht möglich, weil der Rezeptor für die MLV-Hüllproteine auf der Oberfläche der Säugerzellen, welches den Eintritt von amphotropen MLV-Vektoren und den Gentransfer vermittelt, auf fast allen diesen Zellen zu finden ist. Der Wirtszellbereich des amphotropen MLV ist daher nicht spezifisch.

Eine Wirtszellspezifität ist z.B. für den gentherapeutischen Einsatz jedoch von Vorteil, da bei einer Gentherapie außerhalb des Organismus (*ex vivo*) (Anderson et al. 1992; Yu et al., 1997) aufwendige Aufreinigungen von Zellen vermieden werden. Für den Therapie-, Diagnostik- oder Impf-Einsatz *in vivo* ist erwünscht, daß die retroviralen Vektoren gezielt die gewünschten Wirtszellen ansteuern und anschließend das therapeutische Gen übertragen. Eine Einengung des Wirtszellbereichs des amphotropen MLV konnte durch Modifikation des Oberflächenhüllproteins erreicht werden. Eine Modifikation des Oberflächenhüllproteins wurde durch die Fusion mit einer Hormondomäne durchgeführt. Es fand eine Transduktion der Zellen statt, die den spezifischen Hormonrezeptor trugen (Kasahara et al., 1995). Ferner wurde das Oberflächenhüllprotein durch Fusion mit einem einkettigen Antikörperfragment

(*single chain variable fragment*, nachfolgend auch „scFv“ bezeichnet) modifiziert. Das Fragment repräsentierte die antigenbindende Domäne eines Antikörpers und ist ein Fusionsprotein, das aus den variablen Domänen Vh und Vl eines monoklonalen Antikörpers zusammengesetzt ist. Die beiden Domänen sind über ein Glycin- und Serin-Oligopeptid [-(sergly4)3-gly-)] verknüpft, das die korrekte Faltung des Fusionsproteins ermöglicht (Huston et al., 1991; Whitlow et al., 1991). Alle bisher durchgeführten Modifikationen des MLV-Oberflächenhüllproteins mit einem scFv zeigten, daß es zwar zu einer Bindung der Vektoren an die Wirtszelle kam, nicht jedoch zu einem Eintritt in die Zelle (Russel et al., 1993). Weiterhin ist bekannt, daß das Oberflächenhüllprotein des MLV generell keine umfangreichen Modifikationen erlaubt (Cosset et al., 1995). Modifikationen, bei denen ein Teil der Bindungsdomäne des MLV-SU-Proteins ersetzt wurde, führten oft zu einer inkorrekten Prozessierung und somit zu einem defekten Transport des SU-Proteins an die Zelloberfläche (Weiss et al., 1993; Morgan et al., 1993; Russel et al., 1993). Die Entwicklung zellspezifischer retroviraler Vektoren auf Basis des MLV mit veränderten Oberflächenhüllproteinen ist daher wenig erfolgversprechend.

Retrovirale Vektoren auf Basis des Milznekrosevirus SNV („Spleen Necrosis Virus“) sind für einen gezielten Gentransfer in z.B. humane Zellen geeigneter, da das Oberflächen-hüllprotein des SNV umfangreiche Modifikationen erlaubt und auch dann noch korrekt prozessiert wird (Martinez und Dornburg, 1995; Chu und Dornburg, 1994, 1995; Jiang et al., 1998). Zur Herstellung derartiger Vektoren benötigt man mindestens zwei Komponenten. Zum einen ist ein sog. Expressionskonstrukt herzustellen, das eine Verpackung in und den Transfer durch einen Retrovirus erlaubt. Das Expressionskonstrukt umfaßt ein kodierendes DNA-Fragment des gewünschten Genprodukts, z.B. ein Gen für die Gentherapie oder als Impfstoff. Das Expressionskonstrukt muß eine Nukleotidsequenz umfassen, die als Verpackungssignal psi (ψ) bezeichnet wird und die effiziente Verpackung der mRNA in retrovirale Partikel steuert. Ferner benötigt man eine Verpackungs- oder Helfezelle, welche die gag-, pol- und env-Genprodukte des SNV bereitstellt, ohne daß die gag-, pol- und env-Gene in ein Retrovirus verpackt werden können. Die in der Verpackungszelle befindlichen gag-, pol- und env-Gene müssen psi-negativ sein. Nach Überführung des Expressionskonstruktes durch Transfektion der entsprechenden Plasmid-DNA in die Verpackungszellen werden retrovirale Partikel in den Zellkulturüberstand abgegeben, die das Expressionskonstrukt enthalten und nur dieses, nicht

jedoch die gag-, pol-, und env-Gene in die Zielzelle überführen können. Diese Vektoren sind vermehrungsunfähig und durchlaufen lediglich eine Replikationsrunde. Das allgemeine Verfahren zur Herstellung von vermehrungsunfähigen retroviralen Vektoren ist Stand der Technik (Russel et al., 1993; Cosset et al., 1995; Weiss et al., 1993; Morgan et al., 1993; Martinez und Dornburg, 1995; Chu und Dornburg, 1994, 1995; Jiang et al., 1998).

Auch der Tropismus (Wirtszellspezifität des Milznekrosevirus wird durch das Oberflächenhüllprotein (SU-Protein) bestimmt, das vom env-Gen des SNV codiert wird. Das Wildtyp-SNV-Oberflächenhüllprotein läßt keinen selektiven Gentransfer in bestimmte Zellen oder Gewebe des Menschen zu, da das spezifische Empfängerprotein (Rezeptor) nicht auf der Oberfläche von humanen Zellen vorhanden ist (Dornburg, 1995). Deshalb wurde von Dornburg et al. ein Verfahren entwickelt, um das SU-Protein des SNV gegen die antigenerkennende Domänen von Antikörpern zu ersetzen. Diese [SNV-scFV-Env]-Vektoren mit vier bisher bekannten unterschiedlichen scFv waren in der Lage, das psi-positive Reporterogen, die bakterielle β -Galaktosidase, in die ausgewählte humanen Zielzellen zu übertragen (Chu et al., 1994; Chu et al., 1995; Chu und Dornburg, 1997). Im einzelnen handelte es sich um zwei scFv, die gegen unbekannte Oberflächenantigene auf Brust- und Colocarcinom Zellen exprimiert werden (Chu et al., 1995; Chu und Dornburg, 1997; Jiang et al., 1998), um ein scFv, das gegen den humanen Transferrinrezeptor gerichtet ist und um ein scFv, das das CD34 Oberflächenantigen erkennt. Es wurde eine Verpackungszelllinie (DSH-CXL) entwickelt, die sowohl die psi-negativen SNV-Gene gag, pol und env als auch das psi-positive Reporterogen-Expressionskonstrukt (pCXL) enthält. Nach Transfektion der Verpackungszelle mit der Plasmid-DNA eines weiteren env-Expressionsgens (pTC53 [Expressionsvektor pTC53 und pTC53zeo Jiang et al., 1998]), bei dem das gesamte Oberflächenhüllprotein gegen ein einkettiges Antikörperfragment (scFv) ersetzt wurde, wurden retrovirale Vektoren in den Zellüberstand abgegeben, die auf ihrer Oberfläche neben dem Wildtyp-Oberflächenhüllprotein auch das chimäre [scFv-Env]-Oberflächenprotein trugen. Mit Hilfe dieser Vektoren konnte das Reporterogen in die für die scFv-spezifischen Zielzellen transferiert werden. Bei dem von Dornburg et al. beschriebenen Verfahren zur Herstellung zellspezifischer retroviraler Vektoren ist Fakt, daß nur bereits bekannte und klonierte scFv verwendet werden können.

DE 19752854 A1 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung zelltypspezifischer, von SNV-abgeleitete Targeting-Vektoren. Bisher sind 4 scFv-SNV-Targeting-Vektoren beschrieben worden. Diese sind gegen Tumormarker, den Transferrinrezeptor und gegen das CD34-Oberflächenantigen gerichtet (Chu & Dornburg, 1995, 1997, Jiang et al., 1997). Dabei wurden
5 die scFv von monoklonalen Antikörpern (mAb) abgeleitet. Weiterhin sind bisher Pseudotypvektoren des Typs MLV (HIV) zur spezifischen Transduktion humaner CD4-positiver T-Zellen beschrieben worden (Schnierle & Stitz et al., 1997).

10 Allerdings sind bisher noch keine Vektoren beschrieben worden, die mit hoher Selektivität CD4-unabhängig humane T-Zellen transduzieren können.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher T-Zell-spezifische Vektoren bereitzustellen, die CD4-unabhängig humane T-Zellen transduzieren können.

15 Die Aufgabe wird gelöst durch Zelltargeting-Vektoren, die eine DNA-Sequenz enthalten, die ein einkettiges Antikörperfragment (single chain variable fragment, scFv) codiert, wobei das einkettige Antikörperfragment eine Aminosäuresequenz gemäß einer der Figuren 1 bis 5 hat.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der erfindungsgemäße Zelltargeting-Vektor weiterhin eine DNA-Sequenz, die einen SNV-env Leader gemäß einem der Figuren 1 bis 5 codiert. Die erfindungsgemäßen Zelltargeting-Vektoren sind T-Zell-spezifisch, d.h. die Vektoren induzieren selektiv CD4-unabhängig humane T-Zellen.

25 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform ist der Zelltargeting-Vektor vom SNV (Milznekrosevirus) abgeleitet, besonders bevorzugt ist der von SNV abgeleitete Vektor pTC53.

30 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung enthalten die erfindungsgemäßen Zelltargeting-Vektoren ein therapeutisches Gen. Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Zelltargeting-Vektoren zur Gentherapie, Impftherapie oder Diagnostik.

Mit den erfindungsgemäßen scFv-Vektoren, stehen die ersten scFv- Zelltargeting-Vektoren zur Verfügung, die mit hoher Selektivität und unterschiedlich hoher Effizienz CD4-unabhängig humane T-Zellen transduzieren können.

5 Mittels der erfindungsgemäßen Vektoren ist es möglich folgende T-Zell-assoziierte Krankheiten zu therapieren:

10 (i) Schwere kombinierte Immunschwäche (SCID). Hierbei handelt es sich um einen Defekt des Adenosin-Desaminase-Gens (ada) oder des für die Thyrosinkinase JAK-3 kodierenden Gens (Macchi et al., 1995). Als therapeutisches Gen wird das intakte ada-Gen mittels der erfindungsgemäßen Vektoren in die T-Zellen transferiert.

15 (ii) Erworbene Immunschwäche (AIDS) wird durch die HIV-1 Infektion hervorgerufen. Therapeutische Gene sollen die Replikation oder Integration des Virus inhibieren. Als therapeutische Genprodukte für die intrazelluläre Immunisierung sind dabei Ribozyme, Köder-RNA, transdominant negative Mutanten von HIV-Proteinen oder Antikörperfragmente geeignet (Chang et al., 1994, Ramenzani et al., 1997, Smith et al., 1996, Leavitt et al., 1996, Duan et al., 1995, Levy-Mintz et al., 1996). Diese therapeutischen Gene werden bei der erfindungsgemäßen Verwendung der neuen Zelltargeting-Vektoren in die T-Zellen HIV-1 infizierter Patienten transferiert.

20 Es konnte gezeigt werden, daß mittels der erfindungsgemäßen Vektoren (z.B. Vektoren, enthaltend das in Fig. 1 gezeigte scFv 7A5; nachfolgend als 7A5-Vektoren bezeichnet) humane Makrophagen mit einer Effizienz von 95% transduziert werden. Somit ist mittels dieser 7A5-Vektoren der Transfer therapeutischer Gene auch in HIV-
25 1 infizierte Makrophagen möglich.

(iii) T-Zell assoziierte Lymphome.

30 Die erfindungsgemäßen (scFv-SNV-Env)-Targetingvektoren, enthaltend eine DNA-Sequenz codierend ein einkettiges Antikörperfragment (single chain variable fragment, scFv), wobei das einkettige Antikörperfragment eine Aminosäuresequenz (oder ein Fragment) gemäß einer

der Figuren 1 bis 5 hat, ermöglichen selektiv eine Transduktion humaner T-Zelllinien und zum Teil aus dem Blut isolierter primärer Lymphocyten.

Überraschenderweise zeigen die erfindungsgemäßen Vektoren eine um das Vielfache erhöhte Selektivität für humane T-Zellen im Vergleich zu anderen humanen Zellen. Die 7-A5-Vektoren, d.h. die Vektoren, die das einkettige Antikörperfragment gemäß Fig. 1 oder einen Teil hiervon kodieren, zeigten eine bis um den Faktor 1000 erhöhte Selektivität für humane T-Zellen im Vergleich zu anderen humanen Zellen besitzt (s. Tabelle 2) und eine 4-5 fach erhöhte Selektivität für T-Zellen im Vergleich zu B-Zellen.

10

In Tabelle 1 sind 5 scFv (im einzelnen: 7A5, K6, 7B2, 7E4, 6C3) und ihre Vektortiter auf humanen T-Zellen (C8166), D17 Zellen (Hunde Osteosarkom-Zelllinie, permissiv für SNV) und HeLa Zellen (humane Zervixkarzinom-Zelllinie) dargestellt.

15 In Tabelle 2 sind die Vektortiter von 7A5-Vektoren dargestellt. Aus diesen Daten ist die Effizienz und Spezifität für humane T-Zellen erkennbar. Mittels dieser 7A5-Vektoren konnten auch mittels gentechnisch veränderter SNV-Vektoren ruhende T-Zellen und sogar humane Makrophagen sehr effizient transduziert werden.

20 Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht als einschränkend aufzufassen:

Beispiel 1:

25 Bestimmung der Vektortiter der fünf selektionierten scFv auf D17-, C8166- und HeLa-Zellen

Hierzu wurden die Zellkulturüberstände in drei Verdünnungsstufen (1000µl, 100µl und 10µl) in einem Gesamtvolumen von 1000µl unter Zugabe von 30µg/ml Polybren auf den Zellen (2 x 10⁵ D17 und HeLa, 5 x 10⁵ C8166) titriert. Nach 1,5-2 h Inkubationszeit wurde der vektorhaltige Überstand durch frisches Medium ersetzt.

30

Nach 48 h wurde zur Detektion der transduzierten Zellen eine X-gal Anfärbung durchgeführt (Mikawa et al., 1992) und die blauen Zellen gezählt. Tab. 1 zeigt die Vektortiter der fünf selektionierten scFv auf D17-, C8166- und HeLa-Zellen.

- 5 Die Titration auf D17 (Hundeosteosarkomzelllinie, Watanabe et al., 19) dient als positiv-Kontrolle für die Vektorproduktion. Der Titer von $>10^6$ i.E./ml zeigt, dass alle 5 scFv-Verpackungszellklone mit ungefähr gleicher Effizienz Vektorpartikel in den Zellkulturüberstand abgeben.
- 10 Die Titer auf C8166 Zellen schwanken zwischen 10^3 und 10^6 i.E./ml je nach scFv während die Transduktion auf HeLa Zellen keinen nennenswerten Titer ergab. Diese Tatsache deutet auf eine hohe Selektivität für humane T-Zellen aller fünf scFv-Vektoren hin. Die 7A5Vektoren transduzieren am effizientesten humane T-Zellen (Tabelle 1).

15

ScFv	Titer (i.E./ml)		
	D17	C8166	HeLa
7A5	$>10^6$	1×10^6	$<10^2$
K6	$>10^6$	$2,5 \times 10^5$	$<10^1$
7B2	$>10^6$	2×10^4	$<10^1$
7E4	$>10^6$	2×10^3	$<10^1$
6C3	$>10^6$	2×10^3	$<10^1$

Tab. 1: Vektortiter der fünf scFv-Vektoren

Beispiel 2:**Weitere Charakterisierung der Vektoren**

5

Zur genaueren Charakterisierung werden weitere Transduktionsexperimente mit den Vektoren durchgeführt. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der 7A5-Vektoren dargestellt.

		Titer (i.E./ml)								
	D17	HeLa	TE671	HT1080	293T	C8166	Molt4/8	Jurkat	A301	huPBMC
wt	$>10^6$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$
7A5	$>10^6$	$<10^2$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^2$	1×10^5	1×10^6	3×10^5	1×10^5	$7,5 \times 10^4$

10

Tab. 2: Transduktion verschiedener Zelltypen mittels 7A5- und Wildtyp-Vektoren

15 Die Transduktionen wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle wurden alle Zellen mit Wildtyp-Vektoren (wt) transduziert. Hierbei handelt es sich um Vektorpartikel, die nur das Wildtyp-SNV-Env-Protein und kein scFv besitzen. Diese werden von der Ausgangs-Verpackungszelllinie DSH-cx1 (Chu & Dornburg, 1995, Jiang et al., 1998) in den Kulturüberstand abgegeben. Erwartungsgemäß konnten diese Vektoren humane Zellen nicht
20 transduzieren. Nur die für sie permissiven D17 Zellen konnten mit hoher Effizienz transduziert werden.

Die Titration mit 7A5-Vektoren zeigte eine effiziente Transduktion von mehreren humanen T-Zelllinien (C8166, Molt4-8, Jurkat, A301), während andere humane Zelltypen (HeLa: 25 Cervixcarcinom, TE671: Rhabdomyosarkom, HT1080: Fibrosarkom, 293T: Nierenmark) nicht transduziert wurden. Diese Ergebnisse zeigen, daß die 7A5-Vektoren eine hohe Selektivität für T-Zellen besitzt.

Eine erhöhte Selektivität für T-Zellen wurde auch für Zelltargeting-Vektoren gefunden, die eine DNA-Sequenz enthalten, die für ein einkettiges Antikörperfragment gemäß Figur 2, 3, 4 oder 5 codiert.

Beispiel 3:

5

Transduktion von primären T-Zellen

10 Zur Transduktion von primären T-Zellen wurden aus Blut primäre humane PBMC ("periphere mononukleäre Zellen", die Isolierung von PBMC aus Blut mittels Sucrose-Dichtegradient-Zentrifugation erfolgt nach Standardtechniken) isoliert.

15 Nach dreitägiger Stimulierung mittels PHA (Phytohämagglutinin) und IL-2 bestand die Zellpopulation aus 98% T-Lymphozyten (ermittelt mittels FACS-Analyse mit einem Antikörper gegen den T-Zellmarker CD3 (Stand der Technik)).

20 Die Transduktion dieser Zellen mittels 7A5-Vektoren ergab eine Effizienz von 20% Vektor-positiver Zellen (oder ca. 1×10^5 i.E./ml). Zum Vergleich wurden Transduktionsexperimente mit humanen B-Zellen durchgeführt. Diese konnten etwa fünf-fach schwächer (ca. 4%) transduziert werden als T-Zellen.

25 Stimulierter humane PBMC konnten ferner auch mit den K6- und 7B2-Vektoren (d.h. Vektoren, die das einkettige Antikörperfragment gemäß Fig. 2 oder 3 oder einen Teil hiervon kodieren,) transduziert werden. Dies jedoch mit einer etwa 10-fach niedrigeren Effizienz als mit den 7A5-Vektoren.

Literaturliste

- ANDERSON, (1992) Human Gene Therapy. Science 256: 808-813
- 5 Chang H.K., Gendelman R., Lisiewicz J., Gallo R.C., Ensoli B. (1994). Block of HIV-1 infection by a combination of antisense tat RNA and TAR decoys: a strategy for control of HIV-1. Gene Therapy 1: 208-216
- 10 CHU, T.-H. and DORNBURG, R. (1995). Retroviral vector particles displaying the antigen-binding site of an antibody enable cell-type-specific gene transfer. J. Virol. 69, 2659-2663
- CHU, T.-H. and DORNBURG, R. (1997). Toward highly efficient cell-type-specific gene-transfer with retroviral vectors displaying single-chain antibodies. J. Virol. 71, 720-725
- 15 CHU, T.-H.-T., MARTINEZ, I., SHEAY, W., DORNBURG R. (1994). Cell targeting with retroviral vector particles containing antibody-Envelope fusion proteins. Gene Therapie 1: 292-299
- 20 COSSET, F., MORLING, F., TAKEUCHI, Y., WEISS, R., COLLINS, M., RUSELL, S. (1995). Retroviral Retargeting by Envelopes Expressing an N-terminal Binding Domain. J. Virol 69, No. 10: 6314-632
- Duan L., Zhu M., Bagasra O., Pomerantz R.J. (1995). Intracellular immunization against HIV-1 infection of human T lymphocytes: utility of anti-Rev single-chain variable fragments. Hum. Gene Ther. 6: 1561-1573
- 25 DORNBURG, R. (1995). Reticuloendoteliosis viruses and derived vectors. Gene Therapie 2: 1-10
- 30 ENGELSTÄDTER, M., BOBKOVA, M., BAIER, M., STITZ, J., HOLTKAMP, N., CHU, T.-H.-T., KURTH, R., DORNBURG, R., BUCHHOLZ, C. J., AND CICHUTEK, K. Targeting

human T-cells by retroviral vectors displaying antibody domains selected from a phage display library. (submitted to Human Gene Therapy)

- 5 HUSTON, J. S., MUDGETT-HUNTER, M., TAI, M. S., MCCARTHNEY, J., WARREN, F.,
HABER, E., (1991). Protein engineering of single-Chain Fv proteins and fusion proteins.
Methods Enzymol. 203:46-88
- 10 JIANG A., CHU, T.-H., NOCKEN, F., CICHUTEK, K., and DORNBURG, R. (1998). Cell-
type specific gene transfer into human cells with retroviral vectors that display single-chain
antibodies. J. Virol. 72, 10148-10156
- KASAHARA, N., DOZY, A. M., YUET WAI KAN (1994). Tissue-Specific Targeting of
Retroviral Vectors Through Ligand-Receptor Interactions. Science 266: 1373-1375
- 15 Leavitt M.C., Wong-Staal F., Looney D.J. (1996). Ex vivo transduction and expansion of
CD4+ lymphocytes from HIV+ donors: a prelude to a ribozyme gene therapy trial. Gene Ther.
7: 599-606
- 20 Levy-Mintz P., Duan L., Zhang H., Hu B., Dornadula G., Zhu M., Kulkoski J., Bizub-Bender
D., Skalka A.M., Pomeranz R.J. (1996). Intracellular expression of single-chain variable
fragments to inhibit early stages of the viral life cycle by targeting human immunodeficiency
virus type 1 integrase. J. Virol. 70: 8821-8832
- 25 Macchi P., Villa A., Giliani S., Sacco M.C., Frattini A., Port F., Ugazio A.G., Jonston J.A.,
Candotti F., O Shea J.J., Vezzoni P., Notarangelo L.D. (1995). Mutations of the JAK-3 gene in
patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). Nature 377: 65-68
- 30 MARTINEZ, I. and DORNBURG, R. (1995). Improved retroviral packaging cell lines
derived from spleen necrosis virus. Virology 208, 234-241

MARTINEZ, I., DORNBURG, R. (1995). Mapping of Receptor Binding Domains in the Envelope Protein of Spleen Necrosis Virus. *J. Virol.* 69, No. 7

5 MIKAWA, T., FISCHMANN, D. A., DOUGHERTY, J. P., and BROWN, A. M. C. (1992). In vivo analysis of a new lacZ retrovirus vector suitable for lineage marking in avian and other species. *Exp. Cell Res.* 195, 516-523

10 MORGAN, R. A., Nussbaum, O., Muenchau, D.D., Shu, L., Coutre, L., Andeson, W.F. (1993). Analysis of the functional and the host range-determining regions of the murine ecotropic and amphotropic retrovirus envelope proteins. *J. Virol.* 67: 4712-4721

15 PARVEEN, Z., KRUPETZKI, A., POMERANTZ, R. J., ENGELSTÄDTER, M., CICHUTEK, K., AND DORNBURG, R. Genetically engineered c-type retroviral vectors, derived from spleen necrosis virus, SNV, capable of infecting quiescent cells. (submitted to Nature Biotechnology)

Ramenzani A., Ding S.F., Joshi S. (1997). Inhibition of HIV-1 replication by retroviral vectors expressing monomeric and multimeric hammerhead ribozymes. *Gene Ther.* 4: 861-867

20 RUSSEL, S. J., HAWKINS, R.E., WINTER, G. (1993). Retroviral vectors displaying functional antibody fragments. *Nucleic Acid Res.* 21: 1081-1985

25 SCHNIERLE, B. S., STITZ, J., BOSCH, V., NOCKEN, F., MERGET-MILLITZER, H., ENGELSTADTER, M., KURTH, R., GRONER, B., CICHUTEK, K. (1997). Pseudotyping of murine leukemia virus with the envelope glycoproteins of HIV generates a retroviral vector with specificity of infection for CD4-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(16):8640-8645.

30 Smith C., Lee S.W., Wong E., Gallardo H., Page K., Gaspar O., Lebowski J., Gilboa E. (1996). Transient protection of human T-cells from human immunodeficiency virus type 1 infection by transduction with adeno-associated viral vectors which express RNA decoys. *Antiviral Res.* 32: 99-115

- WATANABE, S. AND TEMIN, H. M. (1983). Construction of a helper cell line for avian reticuloendotheliosis virus cloning vecotrs. *Moll. Cell Biol.* 3: 2241-2249
- 5 WEISS, R. (1993). Cellular receptors and viral glycoproteins involved in retroviral entry. In J.A.Levy (ed.). *The Retroviridae* 2: 1-108
- WHITLOW, M. AND FILPULA, D., (1991). Single-Chain Fv proteins snd their fusion proteins. *Methods: Acompanion to Methods Enzymol.* 2:97-105
- 10 YU, J. S., BURWICK, J. A., DRANOFF, G., BREAKFIELD, X., (1997). Gene Therapy for metastatic Brain Tumors by Vaccination with Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulation Factor-Transduced Tumor Cells. *H. Gene Therapy* 8:1065-1072

Patentansprüche

1. Zelltargeting-Vektor enthaltend eine DNA-Sequenz codierend ein einkettiges Antikörperfragment (single chain variable fragment, scFv) dadurch gekennzeichnet, daß das einkettige Antikörperfragment eine Aminosäuresequenz gemäß einer der Figuren 1 bis 5 hat.
2. Zelltargeting-Vektor gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor weiterhin eine DNA-Sequenz enthält, die einen SNV-env Leader gemäß einem der Figuren 1 bis 5 codiert.
3. Zelltargeting-Vektor gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor T-Zell-spezifisch ist.
4. Zelltargeting-Vektor gemäß einen der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor vom SNV (Milznekrosevirus) abgeleitet ist.
5. Zelltargeting-Vektor gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der von SNV abgeleitete Vektor pTC53 ist.
6. Zelltargeting-Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 5 enthaltend ein therapeutisches Gen.
7. Arzneimittel, enthaltend Zelltargeting-Vektoren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6.
8. Verwendung der Zelltargeting-Vektoren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Gentherapie, Impftherapie oder Diagnostik.
9. Verwendung der Zelltargeting-Vektoren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Therapie T-Zell-assoziiierter Krankheiten.

10. Verwendung gemäß Anspruch 7, wobei die T-Zell-assoziierte Krankheit erworbene Immunschwäche (AIDS) oder schwere kombinierte Immunschwäche (SCID) ist.

1/5

7A5-scfv

SNV-env Leader

1 TCCACCACTCTCGACTCAAGAAAGCTCCTGACAACCAAGAAGA ATG GAC TGT CTC ACC AAC CTC CGA TCC 70
 1 M D C L T N L R S 9

71 GCT GAG GGT AAA GTT GAC CAG GCG AGC AAA ATC CTA ATT CTC CTT GTG GCT TGG TGG GGG 130
 10 A E G K V D Q A S K I L I L L V A W W G 29

131 TTT GGG ACC ACT GCC GAA GTT TCG ACT GCC CGA GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTC 190
 30 F G T T A E V S T A R A A Q P A M A E V 49

191 AAG CTG CAG CAG TCA GGG GCT GAG CTG GTG AGG CCT GGG GTC TCA GTG AAG ATT TCC TGC 250
 50 K L Q Q S G A E L V R P G V S V K I S C 69

251 AAG GGT TCT GGC TAC ACA TTC ACT GAT TAT GGT ATG AGC TGG GTG AAA CAG AGT CAT GCA 310
 70 K G S G Y T F T D Y G M S W V X Q S H A 89

311 AAG AGT CTA GAG TGG ATT GGA CTT ATT AGT ACT TAC TAT GGT GAT CCT AGT TAC AAC CAG 370
 90 K S L E W I G L I S T Y Y G D P S Y N Q 109

371 AGG TTC AAG GGC AAG GCC ACA ATG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AAC ACA GCC TAT TTG GAA 430
 110 R F K G K A T M T V D X S S N T A Y L E 129

431 CTT GCC AGA CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCC ATT TAT TAT TGT GCA AGA TCG GAT GGT AAT 490
 130 L A R L T S E D S A I Y Y C A R S D G N 149

491 TAC GGG TAT TAC TAT GCT TTG GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACT ACG GTC ACC GTC TCC TCA 550
 150 Y G Y Y A L D Y W G Q G T T V T V S S 169

551 GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAT ATC GAG CTC ACT 610
 170 G G G G S G G G S G G G G S D I E L T 189

611 CAG TCT CCA TCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATA TCC TGC AGA GCC 670
 190 Q S P S S L A V S L G Q R A T I S C R A 209

671 AGT GAA AGT GTT GAT AGT TAT GGC GAT AGT TTT ATG CAC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGA 730
 210 S E S V D S Y G D S F M H W Y Q Q K P G 229

731 CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT CGT GCA TCC AAC CTA GAA TCT GGA GTC CCT GCC AGG 790
 230 Q P P K L L I Y R A S N L E S G V P A R 249

791 TTC AGT GGC AGT GGG TCT GAG TCA GAC TTC ACT CTC ACC ATC GAT CCT GTG GAG GAA GAT 850
 250 F S G S G S E S D F T L T I D P V E E D 269

851 GAT GCT GCA GTG TAT TAC TGT CTG CAA AGT ATG GAA GAT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG 910
 270 D A A V Y Y C L Q S M E D P Y T F G G G 289

911 ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCG GCC GCA TCG GGC TCC GGG GGC GGT GGT TCT GGT GGT 970
 290 T K L E I K R A A A S G S G G G S G S G 309

971 GGT TCT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGC GCC AGC CCA GTC CAG TTT ATC 1030
 310 G S G G G S G G G S G A S P V Q P I 329

Not I

Fig. 1

WO 01/25415 .

2/5

K6 - scFv

1
 1
 28 GCT GAG GGT AAA GTT GAC CAG GCG AGC AAA ATC CTA ATT CTC CTT GTG GCT TGG TGG GGG 87
 10 A E G K V D Q A S K I L I L L V A W W G 29
 88 TTT GGG ACC ACT GCC GAA GTT TCG ACT GCC CGA GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTC 147
 30 F G T T A E V S T A R A A Q P A M A E V 49
 148 AAG CTG CAG GAG TCA GCG ACT GAA CTT GTG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAT CTG TCT TGC 207
 50 K L Q E S G T E L V K P G A S V N L S C 69
 208 AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACC AGC TAC TGG ATG CAC TGG TTG AAG CAG AGG CCT GGA 267
 70 K A S G Y T F T S Y W M H W L K Q R P G 89
 268 CAA GGC CTT GAG TGG ATC GGA GAG ATT GAT CCT GTT GAT AGT TAT ACT AAC TAC AAT CAA 327
 90 Q G L E W I G E I D P V D S Y T N Y N Q 109
 328 AAC TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GTA GAC AAG TCC TCC ACC ACA GTC TAC ATG CAC 387
 110 N F K G K A T L T V D K S S T T V Y M H 129
 388 CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT GCA AGA AAG GGC TAT GCT 447
 130 L S S L T S E D S A V Y Y C A R K G Y A 149
 448 ATG GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC AAC GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA TGC GGT TCA GGC 507
 150 M D Y W G Q G T N V T V S S G G C G S G 169
 508 GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATC GAG CTC ACT CAG TCA CCA GCA ATC ATG 567
 170 G G G S G G G G S D I E L T Q S P A I M 189
 568 TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT ATA AGT TAC 627
 190 S A S P G E K V T M T C S A S S S I S Y 209
 628 ATG CAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGC ACC TCC CCC AAA AGA TGG ATT TAT GAC ACA TCC 687
 210 M H W Y Q Q K P G T S P K R W I Y D T S 229
 688 AAA CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAT TCT 747
 230 K L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S 249
 748 CTC CCA ATC AGC AGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAT CAG CGG AGT 807
 250 L P I S S M E A E D A A T Y Y C H Q R S 269
 808 AGT TAC CCA TGG ACG TTC GGT GGA GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CCG GCG GCC GCA TCG 867
 270 S Y P W T F G G T K L E I K R A A A S 289
 868 GGC TCC GGG GGC GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT 927
 290 G S G G G G S G G G G G G S G G G G 309

Fig. 2

3/5

7B2-sCFv

▶ SNV-env Leader
 1 ATG GAC TGT CTC ACC AAC CTC CGA TCC GCT CAG GGT AAA GTT GAC CAG CGC AGC AAA ATC 60
 1 M D C L T N L R S A E G K V D Q A S K I 20
 61 CTA ATT CTC CTT GTG GCT TGG TGG GGG TTT GGG ACC ACT GCC GAA GTT TCG ACT GCC CGA 120
 21 L I L L V A W W G F G T T A E V S T A R 40
 121 GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGG ACT GAA CTG GCA ACA 180
 41 A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G T E L A T 60
 181 CCT GGG GCC TCA GTG AGG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GCC TAC GCC TTT ACT ACC TAC TGG 240
 61 P G A S V R M S C K A S G Y A F T T Y W 80
 241 ATG CAC TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT GGA TAC ATT AAT CCT 300
 81 M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P 100
 301 ACC ACT GAT TAT ACT GAC TAC AAT CTG AAG TTC AAG GAC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC 360
 101 T T D Y T D Y N L K F K D K A T L T A D 120
 361 AAA TCC TCC AGT ACA GCC TAC ATG CAA CTG AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC 420
 121 K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V 140
 421 TAT TAC TGT GCA AGA TCG GGG TGG TCC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGG CAA GGG ACC ACG 480
 141 Y Y C A R S G W S Y A M D Y W G Q G T T 160
 481 GTC ACC ATC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GCA TCG 540
 151 V T I S S G G G G S G G G S G G G S 180
 541 GAC ATC GAG CTC ACT CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC 600
 181 D I E L T Q S P A I M S A S P G E K V T 200
 601 ATA ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG CAC TGG TTC CAG CAG AAG CCA GGC 660
 201 I T C S A S S S V S Y M H W F Q Q K P G 220
 661 ACT TCT CCC AAA CTC TGG ATT TAT AGC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CGC 720
 221 T S P K L W I Y S T S N L A S G V P A R 240
 721 TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC CGA ATC CAG GCT GAA 780
 241 F S G S G S G T S Y S L T I S R M E A E 260
 781 GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAA AGG AGT AGT TAC CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGC 840
 261 D A A T Y Y C Q Q R S S Y P F T F G S G 280
 841 ACC AAG CTG GAA ATC AAA CCG GCG GCC GCA TCG GGC TCC GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGT 900
 281 T K L E I K R A A A S G S G G G G S G G 300
 901 GGT GGT TCT GGT GGT GGT TCT GGT GGT TCT GGC GCC AGC CCA GTC CAG TTT 960
 301 G G S G G G G S G G G S G A S P V Q F 320
 961 ATC CCC CTG CTT GTG GGT CTA GGG ATT TCA 990
 321 I P L L V G L G I S 330

Fig. 3

4/5

7E4-scFv

▶ SNV-env Leader
 1 ATG GAC TGT CTC ACC AAC CTC CGA TCC GCT GAG GGT AAA GTT GAC CAG GCG AGC AAA ATC 60
 1 M D C L T N L R S A E G K V D Q A S K I 20
 61 CTA ATT CTC CTT GTG GCT TGG TGG GGG TTT GGG ACC ACT GCC GAA GTT TCG ACT GCC CGA 120
 21 L I L L V A W W G F G T T A E V S T A R 40
 Sfi I ▶ 7E4-scFv
 121 GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTC AAG CTG CAG CAG TCA GCG GCT CAG CTG GTG AGG 180
 41 A A Q P A M A E V K L Q Q S G A E L V R 60
 181 CCT GGA GCT TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG ACT TCT GCG TTC TCC TTC ACC AGC TAC TGG 240
 61 P G A S V K L S C K T S G F S F T S Y W 80
 241 ATG AAC TGG GTG AAG CTG AGG CCT GGA CAA GGC CTT GAG TGG ATT GGC ATG ATT CAT CCT 300
 81 M N W V K L R P G Q G L E W I G M I H P 100
 301 TCC GAT AGT GAA ACT AGT TTA ACT CAG AGG TTC AAG GAC AAG GCC ACA CTG ACT GTA GAC 360
 101 S D S E T S L T Q R F K D K A T L T V D 120
 361 AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA CTC AGC AGC CCG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC 420
 121 K S S S T A Y M Q L S S P T S E D S A V 140
 421 TAT TAC TGT GCA AGA TCT CTT TAT GCT AAC TAC CCC TCC TGG TTT ACT TAC TGG GGC CAA 480
 141 Y Y C A R S L Y A N Y P S W F T Y W G Q 160
 481 GGC ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT 540
 161 G T T V T V S S G G G G S G G G G S G G 180
 541 GGC GGA TCG GAC ATC GAG CTC ACT CAG TCT CCA ACC ACC ATG GCT GCA TCT CCC GGC GAC 600
 181 G G S D I E L T Q S P T T M A A S P G E 200
 601 AAG ATC ACT ATC ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT ATA AGT TCC AAT TAC TTG CAT TGG TAT 660
 201 K I T I T C S A S S S I S S N Y L H W Y 220
 661 CAG CAG AAG CCA GGA TTC TCC CCT AAA CTC TTG ATT TAT AGG ACA TCC AAT CTG GCT TCT 720
 221 Q Q K P G F S P K L L I Y R T S N L A S 240
 721 GGA GTC CCA GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATT GGC 780
 241 G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I G 260
 781 ACC ATG GAG GCT GAA GAT GTT GCC ACT TAC TAC TGC CAG CAG GGT AGT AGT ATA CCG TAC 840
 261 T M E A E D V A T Y Y C Q Q G S S I P Y 280
 Not I
 841 ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CCG GCG GCC GCA TCG GGC TCC GGG GGC 900
 281 T F G G G T K L E I K R A A A S G S G G 300
 901 GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT TCT GGT GGT G 946
 301 G G S G G G G S G G G G S G G 315

Fig. 4

5/5

6C3 - scFv

→ SNV-env Leader

```

1 ATG GAC TGT CTC ACC AAC CTC CCA TCC GCT CAC GGT AAA GTT GAC CAG GCC ACC AAA ATC 60
1 M D C L T N L R S A E G K V D Q A S K I 20

51 CTA ATT CTC CTT GTG GCT TGG TGG GGG TTT GGG ACC ACT GCC CAA GTT TCG ACT GCC CCA 120
21 L I L L V A W W G F G T T A E V S T A R 40

121 GCG GCC CAG CGC GCG ATG GCC CAG CCA CAG CTG CAG CAG TCA GCA GCA GAA ATG AAA AAG 180
41 A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G A E M K K 60

181 CCC GCG CAG TCT CTG AAA ATC TCC TGT AAG GGT TTT GCA TAC GAC TTT AGC ACC TAC TGG 240
61 P G E S L K I S C K G F G Y D F S T Y W 80

241 ATG GCC TGG GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TAC ATG GCG CTC ATC TAT CTT 300
81 I A W V R Q M P G K G L R Y M G L I Y P 100

301 GGT CAC TCT GAC ACC AAA TAC AGC CGC TCC TTC CAA GCG CAG GTC ACC ATC TCA GCC GAC 360
101 G D S D T K Y S P S F Q G Q V T I S A D 120

361 AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC CTG CAG TGG ACC ACC CTG AAG GCC TCG GAC ACC GCC ATG 420
121 K S I S T A Y L Q W S S L K A S D T A M 140

421 TAT TAC TGT GCG AGA GTC TCT GCA TAT TGT AGT AGT ACC AGC TGT TAT GAC TAC TAC TAC 480
141 Y Y C A R V S G Y C S S T S C Y D Y Y Y 160

481 TAC TAC ATG GAC CTC TGG GCG CGC GGA ACC CTG CTC ACC CTC TCG AGA GGT GCA GCG GGT 540
161 Y Y M D V W G R G T L V T V S R G G G C 180

541 TCA GCC GGA GGT GCG TCT GCG GGT GCG GGA TCG GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCA TCC 600
181 S G G G G S G G G G S D I V M T Q S P S 200

601 ACC CTC TCT GCA TCT GTA GGA CAC AGA GTC ACC ATG ACT TCG GCG GCC AGT CAG AAC ATT 660
201 T L S A S V G D R V T M T C R A S Q N I 220

661 AAT ATC TCG TTC GCC TCG TAT CAG CAG AAA CCA GCG AAA GCG CCA AAG CTC CTG ATC TAT 720
221 N I W L A W Y Q Q K P G K A P K L L Y Y 240

721 AAG GCG TCC ACT TTA GAC AGT GCG CTC CGC TCA AGG TTC AGC GCG AGT GCA TCT GCG ACA 780
241 K A S T L E S G V P S R F S G S G S G T 260

781 GAA TTC ACT CTC ACC ATC AGC GCG CTG CAG CCA GAT GAT TTT GCA AGT TAT TAC TCT CAA 840
261 E F T L T I S G L Q P D D F A S Y Y C Q 280
Not I

841 GCG TAT GAT AGT GAC TCG TCG TTC GCG CAA GCG ACC AAG CTG CAG ATC AAA GGT GCG GCG 900
281 R Y D S D W S F G Q C T K L E I K R A A 300

901 GCA TCG 906
301 A S 302

```

Fig. 5

WO 01/25415

1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Bundesrepublik Deutschland, letztvertreten durch den Präsidenten
des Paul-Ehrlich-Instituts Prof. Dr. R. Kurth, 63225 Langen

<120> Gentransfer in humane Lymphocyten mittels retroviraler
scFv-Zelltargeting Vektoren

<130> 158-6 PCT

<140> PCT/DE

<141> 2000-09-27

<150> DE 199 46 142.2

<151> 1999-09-27

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1030

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: scFv kodierende Sequenz

<400> 1

```
1 TCCACCACTCTCGACTCAAGAAAGCTCCTGACAACCAAGAAGA ATG GAC TGT CTC ACC AAC CTC CGA TCC 70
1 M D C L T N L R S 9
71 GCT GAG GGT AAA GTT GAC CAG GCG AGC AAA ATC CTA ATT CTC CTT GTG GCT TGG TGG GGG 130
10 A E G K V D Q A S K I L I L L V A W W G 29
131 TTT GGG ACC ACT GCC GAA GTT TCG ACT GCC CGA GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTC 190
30 F G T T A E V S T A R A A Q P A M A E V 49
191 AAG CTG CAG CAG TCA GGG GCT GAG CTG GTG AGG CCT GGG GTC TCA GTG AAG ATT TCC TGC 250
50 K L Q Q S G A E L V R P G V S V K I S C 69
251 AAG GGT TCT GGC TAC ACA TTC ACT GAT TAT GGT ATG AGC TGG GTG AAA CAG AGT CAT GCA 310
70 K G S G Y T F T D Y G M S W V K Q S H A 89
311 AAG AGT CTA GAG TGG ATT GGA CTT ATT AGT ACT TAC TAT GGT GAT CCT AGT TAC AAC CAG 370
90 K S L E W I G L I S T Y Y G D P S Y N Q 109
371 AGG TTC AAG GGC AAG GCC ACA ATG ACT GTA GAC AAA TCC AAC ACA GCC TAT TTG GAA 430
110 R F K G K A T M T V D K S S N T A Y L E 129
431 CTT GCC AGA CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCC ATT TAT TAT TGT GCA AGA TCG GAT GGT AAT 490
130 L A R L T S E D S A I Y Y C A R S D G N 149
491 TAC GGG TAT TAC TAT GCT TTG GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACT ACG GTC ACC GTC TCC TCA 550
150 Y G Y Y A L D Y W G Q G T T V T S S 169
551 GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAT ATC GAG CTC ACT 610
170 G G G G S G G G S G G G S D I E L T 189
611 CAG TCT CCA TCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATA TCC TGC AGA GCC 670
190 Q S P S S L A V S L G Q R A T I S C R A 209
```

```

671 AGT GAA AGT GTT GAT AGT TAT GGC GAT AGT TTT ATG CAC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGA 730
210 S E S V D S Y G D S F M H W Y Q Q K P G 229

731 CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT CGT GCA TCC AAC CTA GAA TCT GGA GTC CCT GCC AGG 790
230 Q P P K L L I Y R A S N L E S G V P A R 249

791 TTC AGT GGC AGT GGG TCT GAG TCA GAC TTC ACT CTC ACC ATC GAT CCT GTG GAG GAA GAT 850
250 F S G S G S E S D F T L T I D P V E E D 269

851 GAT GCT GCA GTG TAT TAC TGT CTG CAA AGT ATG GAA GAT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG 910
270 D A A V Y Y C L Q S M E D P Y T F G G G 289

911 ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCG GCC GCA TCG GGC TCC GGG GGC GGT GGT TCT GGT GGT 970
290 T K L E I K R A A A S G S G G G S G G 309

971 GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGC GCC AGC CCA GTC CAG TTT ATC 1030
310 G S G G G G S G G G G S G A S P V Q F I 329

```

<210> 2

<211> 927

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: scFv kodierende Sequenz

<400> 2

```

1 ATG GAC TGT CTC ACC AAC CTC CGA TCC 27
1 M D C L T N L R S 9

28 GCT GAG GGT AAA GTT GAC CAG GCG AGC AAA ATC CTA ATT CTC CTT GTG GCT TGG TGG GGG 87
10 A E G K V D Q A S K I L I L L V A W W G 29

88 TTT GGG ACC ACT GCC GAA GTT TCG ACT GCC CGA GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTC 147
30 F G T T A E V S T A R A A Q P A M A E V 49

148 AAG CTG CAG GAG TCA GGG ACT GAA CTT GTG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAT CTG TCT TGC 207
50 K L Q E S G T E L V K P G A S V N L S C 69

208 AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACC AGC TAC TGG ATG CAC TGG TTG AAG CAG AGG CCT GGA 267
70 K A S G Y T F T S Y W M H W L K Q R P G 89

268 CAA GGC CTT GAG TGG ATC GGA GAG ATT GAT CCT GTT GAT AGT TAT ACT AAC TAC AAT CAA 327
90 Q G L E W I G E I D P V D S Y T N Y N Q 109

328 AAC TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GTA GAC AAG TCC TCC ACC ACA GTC TAC ATG CAC 387
110 N F K G K A T L T V D K S S T T V Y M H 129

388 CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT GCA AGA AAG GGC TAT GCT 447
130 L S S L T S E D S A V Y Y C A R K G Y A 149

448 ATG GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC AAC GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA TGC GGT TCA GGC 507
150 M D Y W G Q G T N V T V S S G G C G S G 169

508 GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATC GAG CTC ACT CAG TCA CCA GCA ATC ATG 567
170 G G G S G G G G S D I E L T Q S P A I M 189

568 TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT ATA AGT TAC 627
190 S A S P G E K V T M T C S A S S S I S Y 209

628 ATG CAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGC ACC TCC CCC AAA AGA TGG ATT TAT GAC ACA TCC 687
210 M H W Y Q Q K P G T S P K R W I Y D T S 229

688 AAA CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAT TCT 747
230 K L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S 249

```

```

748 CTC CCA ATC AGC AGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAT CAG CGG AGT 807
250 L P I S S M E A E D A A T Y Y C H Q R S 269

868 AGT TAC CCA TGG ACG TTC GGT GGA GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCG GCC GCA TCG 867
270 S Y P W T F G G G T K L E I K R A A A S 289

868 GGC TCC GGG GGC GGT GGT TCT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT 927
290 G S G G G G S G G G S G G G S G G G G 309

```

<210> 3

<211> 990

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: scFv kodierende Sequenz

<400> 3

```

      ATG GAC TGT CTC ACC AAC CTC CGA TCC GCT GAG GGT AAA GTT GAC CAG GCG AGC AAA ATC 60
      M D C L T N L R S A E G K V D Q A S K I 20

61 CTA ATT CTC CTT GTG GCT TGG TGG GGG TTT GGG ACC ACT GCC GAA GTT TCG ACT GCC CGA 120
21 L I L L V A W W G F G T T A E V S T A R 40

121 GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGG ACT GAA CTG GCA ACA 180
41 A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G T E L A T 60

181 CCT GGG GCC TCA GTG AGG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC GCC TTT ACT ACC TAC TGG 240
61 P G A S V R M S C K A S G Y A F T T Y W 80

241 ATG CAC TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT GGA TAC ATT AAT CCT 300
81 M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P 100

301 ACC ACT GAT TAT ACT GAC TAC AAT CTG AAG TTC AAG GAC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC 360
101 T T D Y T D Y N L K F K D K A T L T A D 120

361 AAA TCC TCC AGT ACA GCC TAC ATG CAA CTG AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC 420
121 K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V 140

421 TAT TAC TGT GCA AGA TCG GGG TGG TCC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGG CAA GGG ACC ACG 480
141 Y Y C A R S G W S Y A M D Y W G Q G T T 160

481 GTC ACC ATC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG 540
161 V T I S S G G G S G G G G S G G G S G G G G S 180

541 GAC ATC GAG CTC ACT CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC 600
181 D I E L T Q S P A I M S A S P G E K V T 200

601 ATA ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG CAC TGG TTC CAG CAG AAG CCA GGC 660
201 I T C S A S S S V S Y M H W F Q Q K P G 220

661 ACT TCT CCC AAA CTC TGG ATT TAT AGC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CGC 720
221 T S P K L W I Y S T S N L A S G V P A R 240

721 TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC CGA ATG GAG GCT GAA 780
241 F S G S G S G T S Y S L T I S R M E A E 260

781 GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAA AGG AGT AGT TAC CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGC 840
261 D A A T Y Y C Q Q R S S Y P F T F G S G 280

841 ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG GCG GCC GCA TCG GGC TCC GGG GGC GGT GGT TCT GGT GGT 900
281 T K L E I K R A A A S G S G G G G S G G 300

901 GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGC GCC AGC CCA GTC CAG TTT 960
301 G G S G G G S G G G S G A S P V Q F 320

961 ATC CCC CTG CTT GTG GGT CTA GGG ATT TCA 990
321 I P L L V G L G I S 330

```


WO 01/25415

4

<210> 4

<211> 946

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: scFv kodierende Sequenz

<400> 4

```

1 ATG GAC TGT CTC ACC AAC CTC CGA TCC GCT GAG GGT AAA GTT GAC CAG GCG AGC AAA ATC 60
1 M D C L T N L R S A E G K V D Q A S K I 20
61 CTA ATT CTC CTT GTG GCT TGG TGG GGG TTT GGG ACC ACT GCC GAA GTT TCG ACT GCC CGA 120
21 L I L L V A W W G F G T T A E V S T A R 40
121 GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTC AAG CTG CAG CAG TCA GGG GCT GAG CTG GTG AGG 180
41 A A Q P A M A E V K L Q Q S G A E L V R 60
181 CCT GGA GCT TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG ACT TCT GGC TTC TCC TTC ACC AGC TAC TGG 240
61 P G A S V K L S C K T S G F S F T S Y W 80
241 ATG AAC TGG GTG AAG CTG AGG CCT GGA CAA GGC CTT GAG TGG ATT GGC ATG ATT CAT CCT 300
81 M N W V K L R P G Q G L E W I G M I H P 100
301 TCC GAT AGT GAA ACT AGT TTA ACT CAG AGG TTC AAG GAC AAG GCC ACA CTG ACT GTA GAC 360
101 S D S E T S L T Q R F K D K A T L T V D 120
361 AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA CTC AGC AGC CCG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC 420
121 K S S S T A Y M Q L S S P T S E D S A V 140
421 TAT TAC TGT GCA AGA TCT CTT TAT GCT AAC TAC CCC TCC TGG TTT ACT TAC TGG GGC CAA 480
141 Y Y C A R S L Y A N Y P S W F T Y W G Q 160
481 GGC ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT 540
161 G T T V T V S S G G G S G G G S G G 180
541 GGC GGA TCG GAC ATC GAG CTC ACT CAG TCT CCA ACC ACC ATG GCT GCA TCT CCC GGG GAG 600
181 G G S D I E L T Q S P T T M A A S P G E 200
601 AAG ATC ACT ATC ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT ATA AGT TCC AAT TAC TTG CAT TGG TAT 660
201 K I T I T C S A S S S I S S N Y L H W Y 220
661 CAG CAG AAG CCA GGA TTC TCC CCT AAA CTC TTG ATT TAT AGG ACA TCC AAT CTG GCT TCT 720
221 Q Q K P G F S P K L L I Y R T S N L A S 240
721 GGA GTC CCA GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATT GGC 780
241 G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I G 260
781 ACC ATG GAG GCT GAA GAT GTT GCC ACT TAC TAC TGC CAG CAG GGT AGT AGT ATA CCG TAC 840
261 T M E A E D V A T Y Y C Q Q G S S I P Y 280
841 ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCG GCC GCA TCG GGC TCC GGG GGC 900
281 T F G G G T K L E I K R A A A S G S G G 300
901 GGT GGT TCT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT TCT GGT GGT G 946
301 G G S G G G G S G G G G S G G 315

```

<210> 5

<211> 906

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: scFv kodierende Sequenz

WO 01/25415

5

<400> 5
 ATG GAC TGT CTC ACC AAC CTC CGA TCC GCT GAG GGT AAA GTT GAC CAG GCG AGC AAA ATC 60
 M D C L T N L R S A E G K V D Q A S K I 20
 61 CTA ATT CTC CTT GTG GCT TGG TGG GGG TTT GGG ACC ACT GCC GAA GTT TCG ACT GCC CGA 120
 21 L I L L V A W W G F G T T A E V S T A R 40
 121 GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GGA GCA GAA ATG AAA AAG 180
 41 A A Q P A M A Q V Q L Q Q S G A E M K K 60
 181 CCC GGG GAG TCT CTG AAA ATC TCC TGT AAG GGT TTT GGA TAC GAC TTT AGC ACC TAC TGG 240
 61 P G E S L K I S C K G F G Y D F S T Y W 80
 241 ATC GCC TGG GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TAC ATG GGG CTC ATC TAT CCT 300
 81 I A W V R Q M P G K G L E Y M G L I Y P 100
 301 GGT GAC TCT GAC ACC AAA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC GAC 360
 101 G D S D T K Y S P S F Q G Q V T I S A D 120
 361 AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC ACC GCC ATG 420
 121 K S I S T A Y L Q W S S L K A S D T A M 140
 421 TAT TAC TGT GCG AGA GTC TCT GGA TAT TGT AGT AGT ACC AGC TGC TAT GAC TAC TAC TAC 480
 141 Y Y C A R V S G Y C S S T S C Y D Y Y Y 160
 481 TAC TAC ATG GAC GTC TGG GGC CGG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCG AGA GGT GGA GGC GGT 540
 161 Y Y M D V W G R G T L V T V S R G G G G 180
 541 TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCT TCC 600
 181 S G G G G S G G G G S D I V M T Q S P S 200
 601 ACC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATG ACT TGC CGG GCC AGT CAG AAC ATT 660
 201 T L S A S V G D R V T M T C R A S Q N I 220
 661 AAT ATC TGG TTG GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT 720
 221 N I W L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y 240
 721 AAG GCG TCC ACT TTA GAG AGT GGG GTC CCG TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA 780
 241 K A S T L E S G V P S R F S G S G S G T 260
 781 GAA TTC ACT CTC ACC ATC AGC GGC CTG CAG CCT GAT GAT TTT GCA AGT TAT TAC TGT CAA 840
 261 E F T L T I S G L Q P D D F A S Y Y C Q 280
 841 CGG TAT GAT AGT GAC TGG TCG TTC GGC CAA GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA CGT GCG GCC 900
 281 R Y D S D W S F G Q G T K L E I K R A A 300
 901 GCA TCG
 301 A S 906

<210> 6

<211> 329

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: scFv von SEQ ID
 NO: 1 kodiert

<400> 6

Met Asp Cys Leu Thr Asn Leu Arg Ser Ala Glu Gly Lys Val Asp Gln 15
 1 5 10
 Ala Ser Lys Ile Leu Ile Leu Leu Val Ala Trp Trp Gly Phe Gly Thr 30
 20 25 30

Thr Ala Glu Val Ser Thr Ala Arg Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu
 35 40 45
 Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Val Ser
 50 55 60
 Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Gly
 65 70 75 80
 Met Ser Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly
 85 90 95
 Leu Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Pro Ser Tyr Asn Gln Arg Phe Lys
 100 105 110
 Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu
 115 120 125
 Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 130 135 140
 Arg Ser Asp Gly Asn Tyr Gly Tyr Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
 145 150 155 160
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 165 170 175
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro
 180 185 190
 Ser Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg
 195 200 205
 Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asp Ser Phe Met His Trp Tyr
 210 215 220
 Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser
 225 230 235 240
 Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu
 245 250 255
 Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Ala Ala
 260 265 270
 Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Met Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
 275 280 285
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Ser Gly Ser Gly Gly
 290 295 300
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 305 310 315 320
 Ser Gly Ala Ser Pro Val Gln Phe Ile
 325

WO 01/25415

7

<210> 7

<211> 309

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: scFv von SEQ ID
NO: 2 kodiert

<400> 7
 Met Asp Cys Leu Thr Asn Leu Arg Ser Ala Glu Gly Lys Val Asp Gln
 1 5 10 15
 Ala Ser Lys Ile Leu Ile Leu Leu Val Ala Trp Trp Gly Phe Gly Thr
 20 25 30
 Thr Ala Glu Val Ser Thr Ala Arg Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu
 35 40 45
 Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Thr Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 50 55 60
 Val Asn Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
 65 70 75 80
 Met His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 85 90 95
 Glu Ile Asp Pro Val Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
 100 105 110
 Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Val Tyr Met
 115 120 125
 His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 130 135 140
 Arg Lys Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Asn Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 165 170 175
 Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser
 180 185 190
 Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser
 195 200 205
 Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp
 210 215 220
 Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 225 230 235 240
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Pro Ile Ser Ser Met Glu
 245 250 255

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Ser Tyr Pro
260 265 270

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala
275 280 285

Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
290 295 300

Ser Gly Gly Gly Gly
305

<210> 8

<211> 330

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: scFv von SEQ ID
NO: 3 kodiert

<400> 8

Met Asp Cys Leu Thr Asn Leu Arg Ser Ala Glu Gly Lys Val Asp Gln
1 5 10 15

Ala Ser Lys Ile Leu Ile Leu Leu Val Ala Trp Trp Gly Phe Gly Thr
20 25 30

Thr Ala Glu Val Ser Thr Ala Arg Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln
35 40 45

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Ala Thr Pro Gly Ala Ser
50 55 60

Val Arg Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Thr Tyr Trp
65 70 75 80

Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
85 90 95

Tyr Ile Asn Pro Thr Thr Asp Tyr Thr Asp Tyr Asn Leu Lys Phe Lys
100 105 110

Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
115 120 125

Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
130 135 140

Arg Ser Gly Trp Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
145 150 155 160

Val Thr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
165 170 175

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
180 185 190

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser
 195 200 205

Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys
 210 215 220

Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
 225 230 235 240

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg
 245 250 255

Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser
 260 265 270

Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
 275 280 285

Ala Ala Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 290 295 300

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Pro Val Gln Phe
 305 310 315 320

Ile Pro Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile Ser
 325 330

<210> 9

<211> 315

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: scFV von SEQ ID
 NO: 4 kodiert

<400> 9

Met Asp Cys Leu Thr Asn Leu Arg Ser Ala Glu Gly Lys Val Asp Gln
 1 5 10 15

Ala Ser Lys Ile Leu Ile Leu Leu Val Ala Trp Trp Gly Phe Gly Thr
 20 25 30

Thr Ala Glu Val Ser Thr Ala Arg Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu
 35 40 45

Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser
 50 55 60

Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Phe Ser Phe Thr Ser Tyr Trp
 65 70 75 80

Met Asn Trp Val Lys Leu Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 85 90 95

Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Ser Leu Thr Gln Arg Phe Lys
 100 105 110

Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 115 120 125
 Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 130 135 140
 Arg Ser Leu Tyr Ala Asn Tyr Pro Ser Trp Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
 145 150 155 160
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 165 170 175
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Thr
 180 185 190
 Thr Met Ala Ala Ser Pro Gly Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Ala
 195 200 205
 Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 210 215 220
 Gly Phe Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 225 230 235 240
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
 245 250 255
 Leu Thr Ile Gly Thr Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
 260 265 270
 Gln Gln Gly Ser Ser Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 275 280 285
 Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 290 295 300
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 305 310 315

<210> 10

<211> 302

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: scFV von SEQ ID
 NO: 5 kodiert

<400> 10

Met Asp Cys Leu Thr Asn Leu Arg Ser Ala Glu Gly Lys Val Asp Gln
 1 5 10 15

Ala Ser Lys Ile Leu Ile Leu Leu Val Ala Trp Trp Gly Phe Gly Thr
 20 25 30

Thr Ala Glu Val Ser Thr Ala Arg Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln
 35 40 45
 Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Met Lys Lys Pro Gly Glu Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Phe Gly Tyr Asp Phe Ser Thr Tyr Trp
 65 70 75 80
 Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly
 85 90 95
 Leu Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 100 105 110
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 115 120 125
 Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 130 135 140
 Arg Val Ser Gly Tyr Cys Ser Ser Thr Ser Cys Tyr Asp Tyr Tyr Tyr
 145 150 155 160
 Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg
 165 170 175
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
 180 185 190
 Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 195 200 205
 Arg Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Ile Trp Leu
 210 215 220
 Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 225 230 235 240
 Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 245 250 255
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro Asp
 260 265 270
 Asp Phe Ala Ser Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asp Ser Asp Trp Ser Phe
 275 280 285
 Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Ser
 290 295 300

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. April 2001 (12.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/25415 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/86,
15/867, 15/79, 5/10, A61K 48/00, C07K 16/28

[DE/DE]: Theodor-Heuss-Strasse 54, 63225 Langen (DE).
ENGELSTÄDTER, Martin [DE/DE]: Gebrüder-Grimm-
Strasse 33, 63322 Rödermark (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/03444

(74) Anwälte: VOSSIUS, Volker usw.: Holbeinstrasse 5,
81679 München (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. September 2000 (27.09.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): CA, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

(30) Angaben zur Priorität:
199 46 142.2 27. September 1999 (27.09.1999) DE

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Aus-
nahme von US): BUNDESREPUBLIK DEUTSCH-
LAND letztvertreten durch DEN KOMMIS-
SARISCHEN LEITER DES PAUL-EHRlich-IN-
STITUTS PROF. DR. JOHANNES LÖWER [DE/DE];
Paul-Ehrlich-Strasse 51-59, 63225 Langen (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 7. Februar 2002

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CICHUTEK, Klaus

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: GENE TRANSFER IN HUMAN LYMPHOCYTES USING RETROVIRAL SCFV CELL TARGETING

(54) Bezeichnung: GENTRANSFER IN HUMANE LYMPHOCYTEN MITTELS RETROVIRALER SCFV-ZELLTARGETING
VEKTOREN

(57) Abstract: The invention relates to the gene transfer in human T cells using novel retroviral scFv cell targeting vectors and to
the use of these vectors for treating T cell-associated diseases.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft den Gentransfer in humane T-Zellen mittels neuer retroviraler scFv-Zelltargeting
Vektoren und die Verwendung dieser Vektoren zur Behandlung T-Zell-assoziiierter Krankheiten.

WO 01/25415 A3

